

学校编码: 10384

密级_____

学号: 24520071152577

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

纤溶酶原抗血管生成活性肽
的筛选、鉴定及应用

The screening identification and utilization of the
anti-angiogenesis plasminogen peptide

张秀丽

指导教师姓名: 华先欣 教授

金光辉 副教授

专 业 名 称: 药理学

论文提交日期: 2010 年 5 月

论文答辩日期: 2010 年 5 月

2010 年 5 月

纤溶酶原抗血管生成活性肽的筛选、鉴定及应用

张秀丽

指导教师

华先欣 教授
金光辉 副教授

厦门大学

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

摘要

人纤溶酶原 Kringle5 (Human Plasminogen Kringle 5, K5) 是目前发现的抑制新生血管活性最强的纤溶酶原 (Plasminogen) 片段, 在新生血管性疾病如实体瘤、糖尿病性视网膜增生等多种疾病治疗中具有潜在的应用前景。但是传统的 K5 存在酵母系统生产工艺复杂、生产成本昂贵、应用剂量大等缺陷, 严重制约着 K5 在临床中的应用。本研究中, 我们通过生物信息学方法模拟得到纤溶酶原 Kringle 中保守的氨基酸序列, 合成短肽 $\text{NH}_2\text{-NYCRNPD-COOH}$; 在细胞学和组织学水平验证了该多肽对新生血管内皮细胞增殖、迁移以及鸡胚绒毛尿囊膜血管新生的影响; 选择大鼠角膜碱烧伤模型, 整体水平验证该多肽对血管新生的抑制作用。结果发现, NYCRNPD 多肽可以抑制原代培养人脐静脉血管内皮细胞

(Human Umbilical Vein Endothelial Cells, HUVEC) 的迁移和增殖, 并显著抑制鸡胚绒毛尿囊膜血管新生, 且其抑制作用可以比拟传统的 K5。进一步的动物实验也发现此多肽具有抑制角膜炎症反应和角膜新生血管生长的作用。为深入研究 K5 及 NYCRNPD 多肽抑制 HUVEC 迁移和生长的作用机制, 我们应用 K5 抗体免疫共沉淀 (IP), Tricine-SDS-PAGE 电泳分离、银染的方法, 在 HUVEC 中找到了一个 K5 相互作用蛋白, 经质谱鉴定推测其可能为 APIP2 蛋白, WB 证实其在 HUVEC 有表达。

以上结果表明, NYCRNPD 多肽具有显著的抗血管生成活性。相比传统的 K5, NYCRNPD 多肽具有分子量小、易于穿过角膜、合成简便经济等显著优点, 为我们开发抗血管生成药物, 尤其是开发针对眼部疾病如糖尿病性视网膜增生、角膜血管新生等的药物奠定了坚实基础。

关键词: K5 NYCRNPD 多肽 血管生成

Abstract

Human plasminogen kringle 5 (K5) is found to be the strongest anti-angiogenesis plasminogen fragment. It has potential applications in neovascularization diseases such as solid tumors, proliferative diabetic retinopathy, corneal neovascularization, etc. However, the high costs and traditionally complicated *pichia pastoris* expression system associated with K5 restricted its clinical application. Using bioinformatics methods, we synthesized a peptide NH₂-NYCRNPD-COOH by screening the plasminogen sequence for the conserved amino acid sequences. The anti-angiogenesis activity of K5 was evaluated by assessing the proliferation and migration of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC), the angiogenesis of chick embryo chorioallantoic membrane (CAM) and alkali-burned rat corneal respectively. The results showed that the peptide NYCRNPD can inhibit HUVEC migration and proliferation in vitro, and significantly repress the angiogenesis of CAM. The inhibiting activity of this peptide is as strong as traditional K5. It also inhibited corneal neovascularization and corneal inflammation alkali-burned rat corneal models. Furthermore, an unknown K5 interacting protein was found by immunoprecipitation assay and silver-stained TRICINE-SDS-PAGE, which may be AIP2 protein assessed by mass spectrometry and it was confirmed in HUVEC by WB.

These data suggest that the peptide NYCRNPD has significant anti-angiogenesis activity. It has lower molecular weight; it is more simple and economic to synthesize compared with traditional K5 protein. This research provides a solid foundation for the development and application of anti-angiogenesis drugs, the peptide NYCRNPD, in neovascularization diseases especially in ocular diseases such as proliferative diabetic retinopathy and corneal angiogenesis.

Keywords: K5; NYCRNPD peptide; Angiogenesis

目 录

摘 要.....	I
目 录.....	III
第一部分 纤溶酶原抗血管生成活性肽的筛选、鉴定和应用.....	1
第一章 绪论	2
1.1 血管新生疾病的研究现状.....	2
1.2 人纤溶酶原结构及其表达.....	7
1.3 多肽药物的应用及开发.....	9
1.4 人纤溶酶原 K5 相互作用蛋白的研究现状.....	11
1.5 APIP 蛋白及相关信号通路.....	12
1.6 立题依据	14
第二章 材料与方法	15
2.1 实验材料.....	15
2.2 实验方法.....	19
第三章 结果	32
3.1 人脐静脉血管内皮细胞的培养.....	32
3.2 重组人纤溶酶原 K5 蛋白的表达及活性检测.....	33
3.3 纤溶酶原抗血管生成活性肽的筛选、鉴定和应用.....	37
3.4 NYCRNPD 多肽稳定性的研究	45
3.5 人纤溶酶原 K5 相互作用蛋白筛选.....	47
第四章 讨论	52
参考文献	55
第二部分 menin 对 Wnt 通路调控机制的初步探讨.....	61
第一章 绪论	62

1.1 Menin 及其相关作用	62
1.2 Wnt 信号通路及其主要作用	65
1.3 <i>Pitx2</i> 及其信号通路	69
4.4 立题依据	72
第二章 材料与方法	73
2.1 实验材料	73
2.2 实验方法	77
第三章 结果	88
3.1 <i>MenI</i> ^{+/+} 和 <i>MenI</i> ^{-/-} MEF 细胞中 Wnt 通路的活性	88
3.2 <i>MenI</i> ^{+/+} 和 <i>MenI</i> ^{-/-} MEF 细胞中关键基因的表达调控	89
3.3 表观遗传学研究 menin 对 <i>Pitx2</i> 启动子调控机制	91
第四章 讨论	92
参考文献	95
附 录	104
致 谢	105

Table of Contents

Abstract in Chinese.....	I
Abstract in English.....	II
Part 1 The screening identification and utilization of the anti-angiogenesis plasminogen peptide.....	1
Chapter 1 Introduction.....	2
1.1 Progression of angiogenesis diseases.....	2
1.2 Structure and utilization of human plasminogen kringle 5.....	7
1.3 Utilization of peptide drugs.....	9
1.4 Human plasminogen kringle 5 interaction protein.....	11
1.5 APIP and its signaling pathway.....	12
1.6 Establishment.....	14
Chapter 2 Materials and Methods.....	15
2.1 Materials.....	15
2.2 Methods.....	19
Chapter 3 Results.....	32
3.1 Culture of HUVEC.....	32
3.2 Expression and identification of recombinant K5 protein.....	33
3.3 Screening identification and utilization of NYCRNPD.....	37
3.4 Stability of NYCRNPD.....	45
3.5 Screening for K5 interacting protein.....	47
Chapter 4 Discussion.....	52
Reference.....	55

Part 2 Investigation of the mechenism by which menin regulates Wnt signaling pathway.....	61
Chapter 1 Introduction.....	62
1.1 Menin and its main function.....	62
1.2 Wnt signaling pathway.....	65
1.3 Pitx2 signaling pathway.....	69
1.4 Establishment.....	72
Chapter 2 Meterials and Methods.....	73
2.1 Meterials.....	73
2.2 Methods.....	77
Chapter 3 Results.....	88
3.1 Luciferase assay dectect Wnt signaling pathway.....	88
3.2 Expression of main members of Wnt signaling pathway.....	89
3.3 Epiginetic mechenism of menin on Pitx2	91
Chapter 4 Discussion.....	92
Reference.....	95
Appendices.....	104
Acknowledgement.....	105

第一部分 纤溶酶原抗血管生成活性肽的

筛选、鉴定和应用

第一章 绪论

1.1 血管新生疾病的研究现状

1.1.1 血管新生与疾病

血管新生 (Angiogenesis) 是生理上新的微血管发展成一个血流供应系统的过程。血管新生一方面在生长和发育上扮演重要的角色, 如伤口愈合、女性经期、胎儿生长发育; 另一方面, 异常的血管新生是许多重大疾病的病因和/或重要病理特征, 如肿瘤、角膜新生血管增生、糖尿病性视网膜病变、真皮乳头微血管异常增生性银屑病以及心肌梗塞、脑中风、老年退化性黄斑等。

血管新生概念的提出与肿瘤密切相关。早在 20 世纪 70 年代初, Folkman 首先提出肿瘤的生长和转移都依赖于新生血管的形成和转移的观点, 并提出可以通过抑制肿瘤血管生成来达到抑制肿瘤的形成及生长 (Folkman, 1971)。随后这一观点得到了大量实验的证实, 因而血管新生的概念逐渐形成并被普遍接受。

血管新生在肿瘤的恶性进展中起着重要的作用。血管新生是肿瘤细胞从休眠期转变成恶性并侵袭其他组织的关键, 新生血管大大促进了肿瘤的增殖速度及恶性程度。肿瘤的生长大体上可以分为以下两个阶段: 第一阶段是无血管期肿瘤, 主要依靠周围组织的弥散作用来获取营养物质和排泄代谢产物, 因而其生长速度受到明显限制, 直径一般不超过 1~2mm, 甚至会长时间地潜伏在组织中而无明显进展; 第二阶段是血管期肿瘤, 瘤内出现新生毛细血管并获得进一步生长的能力, 因而迅速生长并发生转移。

异常的血管新生是角膜病变致盲的最常见原因之一。正常角膜组织透明, 无血管, 周围血管终止于角膜缘, 形成血管网, 营养成分由此扩散入角膜。无血管是角膜的主要特征, 也是维持角膜透明的重要条件。在病理状态下, 新生毛细血管由角膜缘处侵入角膜内, 即形成角膜新生血管, 引发角膜水肿、炎症甚至失明。

此外, 异常的血管新生在糖尿病性视网膜病变中也起着关键作用。糖尿病晚期视网膜上可出现广泛的新生血管, 新增血管可以生长在视网膜表层或视神经上。这些新生的血管比正常血管脆弱, 极易破裂使血液流入玻璃体中, 视网膜上新生血管棉絮状渗出增多, 严重损害视力。晚期或严重病例, 反复、大量的出血,

可引起视网膜脱离，最终导致失明。

除肿瘤、角膜血管异常增生以及在糖尿病性视网膜病变等疾病之外，过多或过少的血管新生对其他非成瘤性疾病的形成也有重要作用，现整理如下：

表 1.1 非成瘤性的异常的血管新生或血管功能障碍

Table1.1 Non-tumorigenicity of abnormal angiogenesis or vascular dysfunction

器官	异常的血管新生或血管功能障碍
血管	动脉硬化症，血管瘤，血管内皮瘤，血管形成障碍
皮肤	疣，化脓性肉芽瘤，绒毛生成，kaposi's 恶性毒瘤，瘢痕瘤，过敏性水肿，牛皮藓（皮肤血管增大并变弯曲），褥疮或郁积性溃疡，胃肠溃疡
子宫，卵巢，胎盘	功能障碍性子宫出血（避孕），卵泡囊肿，卵巢排卵-过度刺激，子宫内膜异位症，肿瘤，先兆子痫，胎盘功能不全
腹膜，胸膜	呼吸道疾病，腹水，腹膜硬化（透析患者），支持物形成（腹部手术），转移性扩散
心脏，骨骼肌	超负荷工作，缺血性心脏病和肢体疾病
脂肪组织	肥胖
器官	进程为特点的血管生成或血管故障
骨骼，关节	类风湿性关节炎，滑膜炎，骨软骨破坏，骨髓炎，血管翳增长，骨赘形成，骨癌，无菌性坏死，受损骨折愈合
肝脏，肾脏，肺，耳及其它上皮	炎症和感染过程（肝炎，肺炎，肾炎），哮喘，鼻息肉，移植，肝再生，癌症，肺动脉高血压，糖尿病，肺部和全身性高血压（血管修剪）
脑，神经，眼	早产儿视网膜病变，糖尿病性视网膜病变，脉络膜和其他眼部障碍，软化，癌症，中风，血管性痴呆，阿尔茨海默氏症，
内分泌器官	甲状腺肿大，胰腺移植，甲状腺囊肿
淋巴管	肿瘤转移，淋巴增生性疾病，淋巴水肿
造血系统	艾滋病，血液系统恶性肿瘤

1.1.2 血管新生的影响因素

血管新生的促进因素主要包括缺氧和炎症两个方面，二者均有助于非肿瘤性疾病的血管新生。

缺氧是许多疾病血管新生的强有力的刺激因子。在肿瘤、伤口或是动脉粥样硬化斑块处，由于血管分布距离较远，会使得细胞缺氧。在糖尿病、Alzheimer's

病、哮喘疾病中，由于细胞外基质的异位沉积或者是血管的梗阻亦可使得氧气的运输受阻最终导致缺氧 (Boulton AJ, 1998)。同样在高血压期造成的血管修剪或早产儿暴露于高氧后也会使得氧气供给受限。目前研究发现，缺氧激活的缺氧诱导因子 (hypoxia-inducible transcription factors, HIFs) 是其调控的主开关，它可以调控包括血管内皮生长因子 (VEGF)、一氧化氮合酶 (NOS)、血小板源性生长因子 (PDGF), Ang II 和其他几个血管生成因子的表达 (Semenza GL, 1998)。缺氧产生的血管新生虽然可以一定程度上拯救缺氧缺血性心肌病患者的生命，延长中风患者的存活率，但同时也可能导致早产儿和糖尿病患者失明 (Alon T, 1995)，或使动脉粥样硬化斑块破裂出血。缺氧不但刺激血管新生，也导致血管重建。例如在一些慢性阻塞性肺疾病中，缺氧造成不可逆转的血管损失和血管肌层增厚，产生肺动脉高压甚至危及生命 (Rabinovitch M, 1999)。这种血管重建是由于长期的血管扩张 (Nitric Oxide) 和收缩 (Endothelin-1) 的失衡所致。

炎症是许多器官长期和过度血管生成的另一重要刺激因子。单核细胞、巨噬细胞、血小板、肥大细胞和白细胞等炎性细胞可以释放多种血管生长因子，包括血管内皮生长因子 (VEGF), Ang I, bFGF, TGF- β 1, 血小板源性生长因子 (PDGF), 肿瘤坏死因子 (TNF), 肝细胞生长因子 (HGF), 胰岛素样生长因子 1 (IGF1) 以及单核细胞趋化蛋白-1 (MCP - 1) 等 (Pinedo HM, 1998; Seljelid R, 1999)。其中有些因子可损伤细胞，进而使后者释放更多的血管生长因子 (Schaper W, 1996; Coussens LM, 1999)。血细胞内含有蛋白酶，一方面可以降解细胞外解剖屏障增加血管内皮细胞的迁移能力 (Heymans S, 1999)，另一方面可激活并释放生长因子至细胞外基质中 (Coussens LM, 1999; Carmeliet P, 1998)。血细胞也参与了血管生成的负性调控，它们释放血小板因子 4 和血小板凝血酶敏感蛋白等血管生成抑制剂，使纤溶酶原蛋白 (plasminogen) 水解转化为血管抑制素 (angiostatin)，使胶原蛋白 XVIII 转化成 endostatin (O'Reilly M S, 1994, 1997)。目前面临的挑战是，创伤或肿瘤中的血管源细胞的浸润程度如何决定血管生成。炎症过程中发生的血管舒张及通透性增加可能是其主要致病机制，尽管其中并无血管生成的参与，例如水肿可导致中风后的梗塞区扩展，并可能导致癌症患者危及生命的颅内高压。此外，血浆蛋白外渗有利于隐匿性肿瘤转移扩散，气道阻塞可能导致致命的哮喘发作。

1.1.3 血管生成抑制剂

血管新生主要发生在胚胎早期,成年机体的血管新生不如胚胎时期旺盛和普遍,血管新生的速度在生理状态下也远比病理状态下缓慢,这与体内存在血管新生抑制因子有关。这些抑制因子主要包括:血管新生抑制素(Angiostatin),内皮生成抑素(Endostatin),组织金属蛋白酶抑制物(Tissue Inhibitor of Metalloproteinase, TIMP),凝血酶敏感蛋白(Thrombospondin, TSP)和血小板因子4(Platelet Factor-4, PF-4)等。主要的血管生成抑制剂及其功能归纳于表1.2。

表 1.2 主要的血管生成抑制剂及其功能

Table1.2 Main anti-angiogenesis factors and its function

抑制因子	功能
VEGFR-1;可溶性 VEGFR-1;可溶性 NRP-1	结合 VEGF,VEGF-B,PlGF
Ang2	Ang1 的拮抗物
TSP-1,TSP-2	抑制内皮细胞迁移,生长,粘附,寿命
血管抑素及相关纤溶酶原 Kringle	抑制细胞血管生成
内皮抑素(胶原 XVIII降解产物)	抑制内皮细胞存活和迁移
血管内皮抑制素;钙网蛋白	抑制内皮细胞生长
血小板因子 4	抑制 bFGF 和 VEGF 的结合
TIMPS;MMP 抑制剂; PEX	抑制病理性血管生成
Meth-1; Meth-2	含 MMP,TSP 及去整合区域的抑制因子
IFN-a, IFN-b, IFN-c; IP-10; IL-4;IL-12;IL-18	抑制内皮细胞迁移,下调 bFGF 水平
凝血酶原 Kringle 2, 抗凝血酶III降解片段	抑制内皮细胞生长
泌乳素(Mr, 16K)	抑制 bFGF/VEGF
VEGI	调节细胞生长
SPARC 的降解片段	抑制 VEGF 对内皮细胞的结合和激活
骨桥蛋白片段	干扰 Integrin 信号通路
Maspin	蛋白酶抑制剂
Canstatin, Proliferin 相关蛋白, Restin	机制未知

1.1.4 抑制血管新生的药物

目前抑制血管新生的药物主要有以下几种：

血管抑素 (Angiostatin)：是人类及其它几种动物体内天然存在的一种内源性血管生成抑制剂，由纤溶酶原 (Plasminogen) 自我剪切而成。人血管抑素是 57KD 大小的纤溶酶 (Plasmin) 的降解产物，而纤溶酶又是纤溶酶原的降解产物。它由几个连续的环状结组成，每一个环包括两个 β 折叠和三个二硫键结构。其他酶类如金属蛋白酶 (MMP)、弹性蛋白酶 (Elastase)、前列腺特异性抗原 (PSA)、13KD 丝氨酸蛋白酶 (13KD Serine Protease)、24KD 内肽酶 (24KD Endopeptidase) 等降解纤溶酶原后，也能获得人血管抑素。目前人血管抑素具体的作用机理尚未阐明，其机理可能与抑制血管内皮细胞迁移、分裂增殖以及诱导血管内皮细胞凋亡有关。

内皮抑素 (Endostatin)：内皮抑素是 1997 年 O'Reilly 等人从培养的小鼠内皮细胞瘤 (EOMA) 上清中分离纯化得到的一种内源性血管生成抑制剂，分子量为 20kD 的蛋白质。晶体结构分析发现，内皮抑素结构表面有一由 11 个精氨酸残基组成的碱性区域，为肝素结合位点。这解释了内皮抑素对肝素的高亲和力特性，可能是通过该区域与血管生成因子竞争结合肝素，起到抑制血管生成的作用。但也有研究表明内皮抑素与血管壁的结合不依赖于肝素结合位点，且与 FGF-2 无竞争性抑制作用。此外，在内皮抑素序列中发现由其 N 端第 1、3、11 位 3 个组氨酸与第 76 位的天冬氨酸残基组成的锌离子结合位点。锌与内皮抑素的 N 端环绕形成一个二聚体结构。最初认为内皮抑素与锌离子结合对其抗血管生成活性很重要，但其后通过基因修饰方法去除锌离子结合位点的研究表明，内皮抑素抑制内皮细胞的迁移及肿瘤的生长并不依赖锌离子结合位点。

沙立度胺 (Thalidomide)：医学史上最具争议性的药物之一。具有催眠作用，可对外周神经造成损害，导致严重的胚胎发育缺陷；具有抗感染功能，可提高人体的免疫能力、抑制 HIV 的复制，并抑制某些恶性肿瘤的生长；可降低 $\text{TNF}\alpha$ 的水平；可导致细胞凋亡、增殖、分化、炎症及肿瘤发生。

Avastin：以 VEGF 为靶标的人源化单克隆抗体 (MAb)，是第一个在 III 期临床试验中显示出抗癌效应的抗血管生成药物。可以导致肿瘤血管的退行性改变；降低肿瘤间质液体压力，从而促使细胞毒药物进入肿瘤；可抑制肿瘤新血管的生成，进而抑制肿瘤生长。

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库